

DISTROFINA NA DIFERENCIAÇÃO DAS DISTROFIAS DE DUCHENNE E BECKER

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO COMPARADO COM O ESTÁDIO CLÍNICO, ENZIMAS SÉRICAS E BIÓPSIA MUSCULAR

LINEU CESAR WERNECK * — EDUARDO BONILLA **

RESUMO — Foram estudados 55 casos de distrofia muscular progressiva (34 Duchenne, 12 Duchenne com distrofina residual e 9 Becker), comparando idade, época de início e tempo de sintomas, graduação na escala de Vignos e Archibald, níveis de enzimas séricas e presença de distrofina nas biópsias musculares por imunofluorescência. A intensidade dos sintomas, gravidade do quadro clínico, proliferação de tecido conjuntivo endomisial e infiltração por tecido adiposo estão inversamente relacionadas à quantidade de distrofina presente nas biópsias e, diretamente, à presença de fibras hipertróficas e fibras angulares escuras atroficas. Nos comentários são abordados alguns aspectos sobre a diferenciação da distrofia muscular de Duchenne e Becker, a distrofina residual nos casos de Duchenne e a importância do teste para o diagnóstico adequado.

Dystrophin in the differentiation between Duchenne and Becker muscular dystrophies: an immunofluorescence study of dystrophin in muscle biopsies related with the clinical stage, serum enzymes and histological findings.

SUMMARY — Study of 55 cases of progressive muscular dystrophies (34 Duchenne, 12 Duchenne with residual dystrophin and 9 Becker patients) comparing age, age at the initial symptoms, duration of symptoms, levels of serum enzymes, degree of disability measured by the Vignos and Archibald scale, and the type and amount of dystrophin found in the muscle biopsies by immunofluorescence. Statistical analysis showed a tendency of the symptoms and progression of disease to be related with the low quantity of dystrophin in the biopsies. There was no difference in the parameter analysed between the Duchenne patients with and without residual dystrophin, as well as the Duchenne with residual dystrophin and Becker patients. There was an inverse relation with the amount of dystrophin and the endomysial connective tissue and fatty infiltration, and a direct relation with hypertrophic fibers and atrophic angulated fibers in the NADH-tetrazolium reductase. In the comments a discussion is made about the difficulties in differentiate Duchenne and Becker dystrophies, the cases with residual dystrophin and the importance of the correct diagnosis.

A determinação do locus do gene da distrofia muscular progressiva de Duchenne permitiu identificar o respectivo produto, uma proteína de 400 kilodaltons que foi chamada distrofina, existente em pessoas normais e associada às tríades do sistema sarcotomular^{10,13,15,19}. A distrofina foi detectada nas membranas externas das fibras musculares estriadas e lisas, bem como em neurônios cerebrais e da medula espinhal^{3,12}. A heterogeneidade das apresentações clínicas e a variação da intensidade dos sintomas, em formas mais benignas como a distrofia muscular de Becker, parecem estar relacionadas ao nível e intensidade das deleções que ocorrem no DNA dos pacientes^{8,9,18}.

Trabalho realizado no Serviço de Doenças Neuromusculares da Especialidade de Neurologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Curitiba) e H. Houston Merritt Clinical Research Center for Muscular Dystrophy and Related Diseases, Columbia University (New York): * Professor Adjunto de Neurologia; ** Professor Associado de Neurologia.

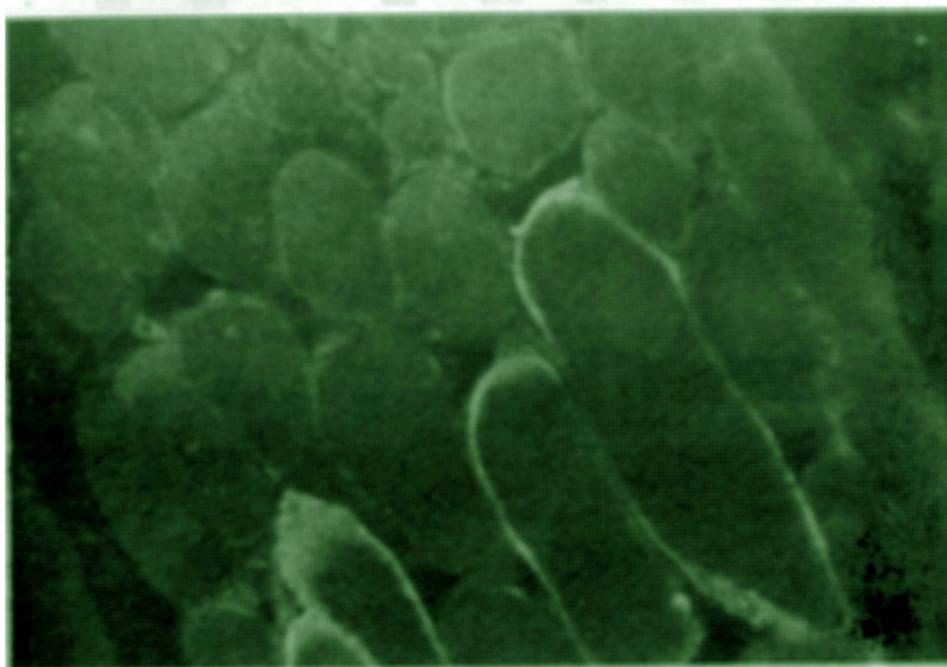
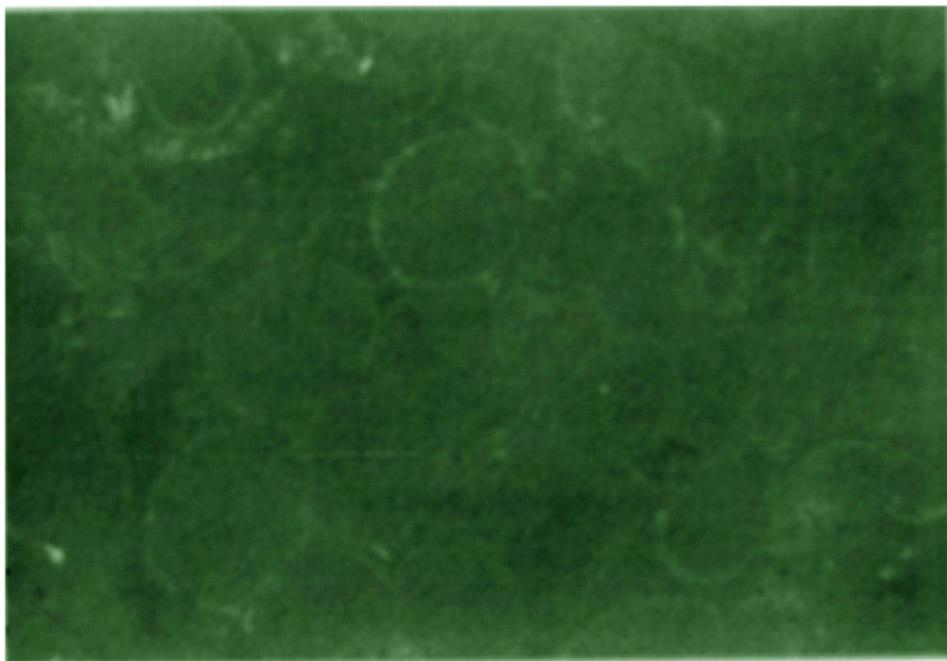


Fig. 1 (no alto) — Imunofluorescência para dístrofina em paciente com dístrofia muscular de Duchenne, com ausência de fluorescência nas membranas externas das fibras, 400X.

Fig. 2 (em baixo) — Imunofluorescência para dístrofina em paciente com dístrofia muscular de Duchenne, com algumas fibras isoladas com fluorescência positiva, 400X.

A fim de verificar se existe relação entre a quantidade de distrofina presente nas membranas das células musculares e o grau de envolvimento clínico dos pacientes, realizamos a presente investigação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 55 pacientes com diagnóstico de distrofia muscular progressiva, sendo inicialmente caracterizados 39 como tipo Duchenne e 16 como Becker, tendo como critérios diagnósticos a história, exame neurológico, dados laboratoriais, eletromiografia e biópsia muscular, processada conforme técnicas em uso corrente em nosso laboratório^{24,25}. Para o estudo, foram selecionadas as variáveis: idade na época da investigação, idade e duração dos sintomas percebidos pela família, dosagens de enzimas séricas em número de vezes aumentada em relação ao limite superior da normalidade e grau na escala de Vignos e Archibald (Tabela 1).

Caso	Idade	Tempo doença	Idade início	CK	LDH	ALD	TGO	TGP	Esc V-A
DUCHENNE									
1	3.00	1.75	1.25	67.00	4.00	11.00	1.00	0.00	1
2	3.74	1.00	2.74	58.70	6.20	0.60	2.30	3.00	1
3	4.00	4.00	0.00	57.20	3.30	11.30	5.20	11.50	3
4	4.20	1.20	3.00	60.00	6.00	13.00	1.00	2.00	3
5	4.50	1.50	3.00	174.00		18.00			3
6	4.58	4.37	0.21	25.00	10.00	28.00	5.00	11.00	2
7	4.67	4.00	0.67	114.50		6.80	6.40	10.70	2
8	5.00	1.00	4.00	31.00	1.00		2.00	3.00	2
9	5.00	1.00	4.00	117.00	9.00	15.00	4.00	4.00	3
10	5.00	3.00	2.00	61.75	3.02	10.29			2
11	6.00	2.00	4.00	24.90	1.90	6.40	4.00	5.00	2
12	6.10	4.00	2.10	9.00	1.17	0.17	2.32	0.00	3
13	6.30	5.25	1.08	24.00	4.00		1.00	2.00	3
14	6.83	5.00	1.83	100.00	5.00	10.00	3.00	3.00	3
15	6.90	4.90	2.00	115.40	6.40	24.10	11.60	8.50	3
16	7.00	3.25	3.75	50.00	10.00	5.00	2.00	5.00	3
17	7.00	5.00	2.00	38.00	4.00	1.00	1.00	1.00	4
18	7.08	6.00	1.08	18.33	1.86	11.90	0.99	0.99	5
19	7.25	5.75	2.00	26.30	2.80	3.30	1.40	2.66	3
20	8.00	1.00	7.00	36.30	0.70	9.00	1.00	3.50	3
21	8.00	5.00	3.00	19.10	0.90	4.00	1.00	0.00	4
22	8.00	6.50	1.50	50.00		0.00	0.00	1.00	4
23	8.00	7.00	1.00	22.00	4.00	5.00	4.00	4.00	6
24	8.16	5.16	3.00	20.66	0.45	1.51	0.99	0.99	4
25	8.42	4.00	4.42	56.10	4.51	15.40	1.50	3.50	3
26	8.92	0.25	8.68	10.00	1.00	1.00	2.00	3.00	7
27	9.08	2.08	7.00	7.00		4.00	2.00	0.00	5
28	10.00	5.00	5.00	7.20	0.00	1.90	0.60	0.80	7
29	10.74	3.00	7.74	50.00	10.00	3.00	0.00	0.00	5
30	11.00	6.00	5.00	20.00	3.00	3.00	1.00	1.00	7
31	11.74			5.00	3.00	3.00	0.00	1.00	7
32	13.33	12.00	1.33	3.00	1.00	2.00			7
33	15.50	8.50	7.00	4.70	0.00	2.70	0.20	0.50	7
34	16.00	12.00	4.00				0.00	0.00	8
Média	7.62	4.29	3.22	44.94	3.73	7.46	2.21	2.99	3.97
SD ±	3.17	2.85	2.26	40.15	3.05	7.06	2.40	3.30	1.96

Tabela 1 — Dados clínicos, enzimas séricas (CK, creatinaquinase; LDH, desidrogenase láctica; ALD, aldolase; TGO, transaminase glutâmico-oxalacética; TGP, transaminase glutâmico-pirúvica) e grau de incapacidade na escala de Vignos-Archibald (Esc V-A) em: 34 casos de distrofia muscular de Duchenne (DUCHENNE), casos 1 a 34; 12 casos de distrofia muscular de Duchenne com distrofina residual (DUCHENNE COM DISTRÓFINA RESIDUAL), casos 35 a 46; 9 casos de distrofia muscular de Becker (BECKER).

Caso	Idade	Tempo doença	Idade início	CK	LDH	ALD	TGO	TGP	Esc V-A
DUCHENNE COM DISTROFIA RESIDUAL									
35	5.90	0.58	5.38	149.00	5.00	22.00	11.00	4.00	3
36	7.00	2.00	5.00	50.50	1.50	15.30	1.30	3.00	3
37	7.00	5.50	1.50	39.70	2.12	4.48	1.55	4.37	3
38	8.00	1.00	7.00	7.00	3.00	10.00	1.00	1.00	3
39	8.00	6.00	2.00	15.00	5.00	8.00	1.00	0.00	3
40	9.00	2.00	7.00	53.00	4.00	6.00	3.00	4.00	3
41	9.00	3.00	6.00	29.00	3.00	6.00	4.00	2.00	4
42	9.00	8.00	1.00	28.00	1.00	6.00	0.00	0.00	5
43	9.08	3.08	6.00	47.00	3.00	9.00	1.00	1.00	3
44	9.88	5.00	4.88	17.00	2.00	8.00	3.00	2.00	8
45	13.58	9.00	4.58	34.26	0.76	4.48	0.96	0.40	6
46	15.66	12.00	3.66	8.00	1.00	2.00	1.00	1.00	8
Média	9.26	4.76	4.50	39.79	2.61	8.44	2.40	1.90	4.33
SD ±	2.78	3.51	2.06	37.86	1.49	5.43	2.94	1.60	1.97
BECKER									
47	3.25	1.00	2.25	15.70					1
48	3.50	1.50	2.00	33.73	1.54	6.38	1.94	1.30	3
49	6.42	3.00	4.42	8.00	2.00	1.00	0.00	0.00	3
50	10.00	1.00	9.00	45.40	1.00	11.20	10.00	6.00	2
51	11.66	6.66	5.00	8.00	1.00	2.00	2.00	2.00	3
52	13.00	5.00	8.00	24.30	0.60		1.00	0.00	3
53	14.00	12.00	2.00	6.40	0.30	1.20	0.80	0.00	4
54	20.00	20.00	18.00	6.73	0.00	3.51	0.00	0.00	2
55	27.00	25.00	2.00	7.00	1.00	0.00	0.00	0.00	3
Média	12.09	8.35	5.85	17.25	0.93	3.61	1.97	1.16	2.67
SD ±	7.73	8.83	5.27	14.23	0.64	3.95	3.35	2.10	0.87

Tabela 1 — Continuação.

A detecção da distrofina por método imuno-histoquímico foi realizada em cortes histológicos de biópsias musculares armazenadas em nitrogênio líquido, com espessura de 4 micra, colhidas em laminulas, previamente preparadas com poli-D-lisina. Essas secções foram incubadas com anticorpos policlonais antidistrofina de ovelha, obtido pela fusão de proteína correspondente aos amino-ácidos 407-815 (60 kDa) da molécula da distrofina. Esse anticorpo foi diluído a 1:1000 em uma solução tampão de cloreto de sódio e fosfato de sódio e 1% de albumina bovina durante duas horas. Após, as secções foram lavadas três vezes durante 5 minutos com a solução tampão sendo, em seguida, incubadas com imunoglobulina biotinilada IgG anti-ovelha diluída a 1:100, por 30 minutos. Novamente lavadas três vezes durante 5 minutos com a solução tampão e incubadas com fluoresceína-streptavidina diluída a 1:250 por 30 minutos. Novamente lavadas com solução tampão por três vezes durante 5 minutos, montadas em glicerina e realizada leitura com microscópio para imunofluorescência, com epi-iluminação. Sempre foram realizados controles incubados com soro não imune, solução tampão salina de fosfato e 1% de albumina bovina^{1,3}. Conforme a intensidade e tipo de imunofluorescência encontrada, as biópsias foram classificadas em: 0. ausência de imunofluorescência (Fig. 1); 1. parcial difusa com pontos ou raras fibras com fluorescência positiva (Fig. 2); 2. distrofina presente na maioria das fibras, mas com falhas focais importantes ou fibras isoladas sem distrofina (Fig. 3); 3. falhas focais discretas, distrofina presente em todas as fibras (Fig. 4); 4. normal.

As alterações foram relacionadas com diversos dados da história clínica e laboratorial, utilizando testes t de Student, qui-quadrado e «plotting» para verificar a curva de tendência das anormalidades.

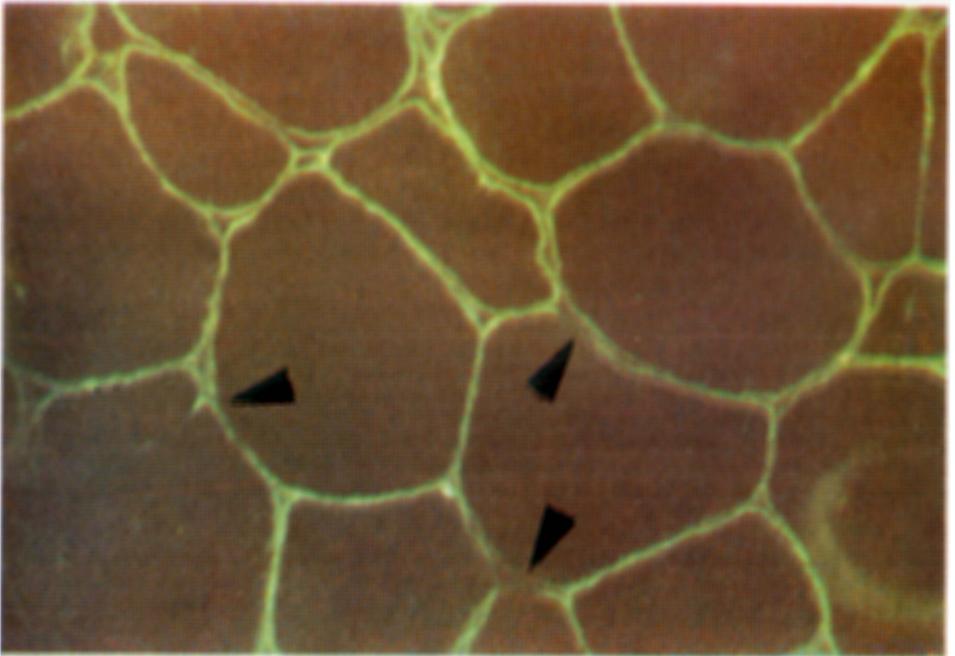
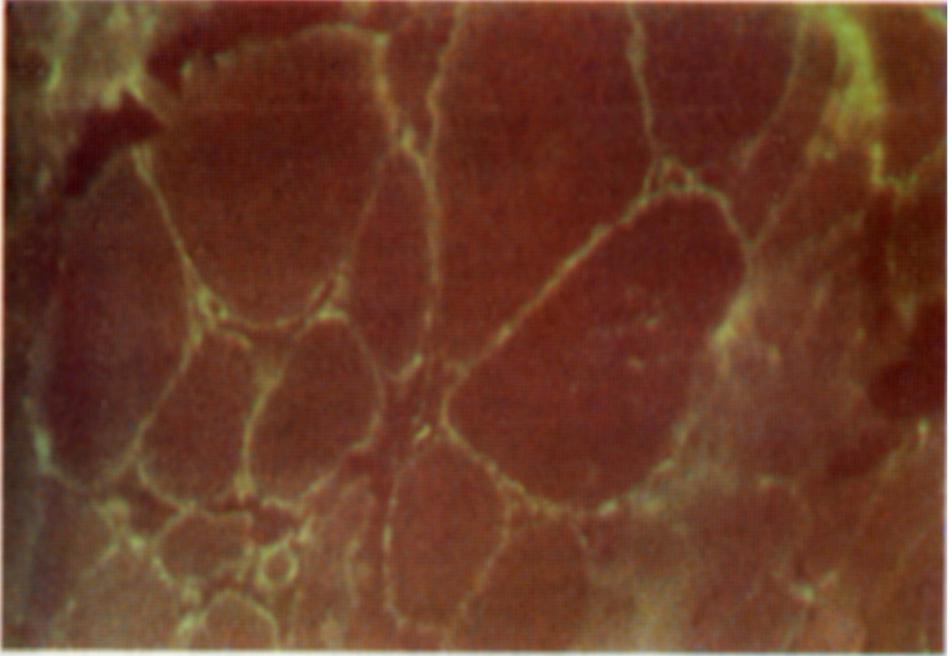


Fig. 3 (no alto) — Imunofluorescência para distrofina em paciente com distrofia muscular de Becker, com falhas focais da fluorescência em grande número de fibras, 400X.

Fig. 4 (em baixo) — Imunofluorescência para distrofina em paciente com distrofia muscular de Becker, mostrando falhas pequenas e grandes isoladas da fluorescência nas membranas das fibras musculares, 400X.

RESULTADOS

Na análise dos 55 casos, a imunofluorescência estava totalmente ausente em 34 e ocorria: somente em raras fibras isoladas com forte intensidade, em 4; em raros grupos de fibras com forte imunofluorescência, em 3; redução difusa, em 3; ocasionais fibras com imunofluorescência fraca ou parcial, em 2; em 9 casos existiam falhas focais no sarcoplasma em todas as fibras com imunofluorescência de forte intensidade (Tabela 2). Baseados nesses dados, reclassificamos os pacientes tendo como parâmetro a análise quantitativa, colocando: os que não possuíam distrofina, como distrofia muscular de Duchenne; os que apresentaram mínima fluorescência ou com raras fibras presentes, na categoria de distrofia muscular de Duchenne com distrofina residual; os que apresentavam distrofina de forte intensidade com falhas focais, como distrofia muscular de Becker.

Com esses dados e estando os doentes reclassificados, estatisticamente não notamos diferença entre os grupos de Duchenne e Duchenne com distrofina residual em todos os parâmetros clínicos analisados. Foram estatisticamente significantes entre os Duchenne e Becker, a média de idade na época da avaliação ($p < 0,05$), tempo de sintomas ($p < 0,05$), idade de início dos sintomas ($p < 0,05$), CK ($p < 0,05$) e LDH ($p < 0,05$). Entre os Duchenne com distrofina residual e Becker, notamos relação estatística com a desidrogenase láctica ($p < 0,01$) e escala de Vignos e Archibald ($p < 0,05$). Comparando aos resultados iniciais da

Caso	Concordância com biópsia	Imunofluorescência para Distrofina (Padrão encontrado)
DUCHENNE		
1	Sim	Ausente
2	Sim	Ausente
3	Não	Ausente
4	Sim	Ausente
5	Não	Ausente
6	Sim	Ausente
7	Sim	Ausente
8	Sim	Ausente
9	Sim	Ausente
10	Não	Ausente
11	Sim	Ausente
12	Não	Ausente
13	Não	Ausente
14	Sim	Ausente
15	Sim	Ausente
16	Sim	Ausente
17	Sim	Ausente
18	Sim	Ausente
19	Não	Ausente
20	Sim	Ausente
21	Sim	Ausente
22	Não	Ausente
23	Sim	Ausente
24	Sim	Ausente
25	Sim	Ausente
26	Sim	Ausente
27	Sim	Ausente
28	Sim	Ausente
29	Sim	Ausente
30	Sim	Ausente
31	Sim	Ausente
32	Sim	Ausente
33	Sim	Ausente
34	Não	Ausente

Tabela 2 — Concordância entre o diagnóstico pelos dados clínicos, biópsia muscular e tipo de padrão encontrado para distrofina nos casos de distrofia muscular de Duchenne (DUCHENNE), distrofia muscular de Duchenne com distrofina residual (DUCHENNE COM Distrofina Residual) e distrofia muscular de Becker (BECKER).

Caso	Concordância com biópsia	Imunofluorescência para Distrofina (Padrão encontrado)
DUCHENNE COM DISTROFIA RESIDUAL		
35	Não	Ocasionais fibras com reação fraca
36	Sim	Grupos de fibras com reação forte
37	Sim	Fibras isoladas com reação forte
38	Sim	Grupos de fibras com reação forte
39	Sim	Fibras isoladas com reação forte
40	Sim	Fibras isoladas com reação forte
41	Não	Grupos de fibras com reação forte
42	Sim	Fibras isoladas com reação forte
43	Sim	Redução difusa da reação
44	Sim	Redução difusa da reação
45	Sim	Redução difusa da reação
46	Sim	Ocasionais fibras com reação fraca
BECKER		
47	Não	Falhas focais - Reação em todas as fibras
48	Não	Falhas focais - Reação em todas as fibras
49	Não	Falhas focais - Reação em todas as fibras
50	Sim	Falhas focais - Reação em todas as fibras
51	Sim	Falhas focais - Reação em todas as fibras
52	Sim	Falhas focais - Reação em todas as fibras
53	Sim	Falhas focais - Reação em todas as fibras
54	Sim	Falhas focais - Reação em todas as fibras
55	Sim	Falhas focais - Reação em todas as fibras

Tabela 2 — Continuação.

clínica e biópsia, notamos que houve concordância das biópsias musculares em 76,4% dos casos. Dos restantes 23,6%, 10 casos de Duchenne foram inicialmente classificados como Becker e três Becker foram classificados como Duchenne. Utilizando os dados da classificação morfológica da intensidade da reação verificamos, por análise gráfica estatística através do «plot», que existe uma relação entre a idade na época da avaliação, tempo de doença, idade de início, CK, LDH, aldolase, transaminase glutâmico-pirúvica e a escala de Vignos e Archibald. Verificamos que, quanto maior for a quantidade de distrofina, menos afetados estão os pacientes na escala de Vignos e Archibald, os sintomas se iniciam mais tarde e as enzimas séricas apresentam menores elevações (Figs. 5, 6, 7 e 8), embora tenha sido estatisticamente significante somente com a idade ($p < 0,001$) e tempo de doença ($p < 0,01$), utilizando o teste do qui-quadrado. Foram relacionados os níveis de distrofina com diversas alterações histológicas encontradas nas biópsias e obtivemos relações significantes com proliferação de tecido conjuntivo ($p < 0,001$), infiltração por tecido adiposo ($p < 0,01$), núcleos internos ($p < 0,05$), presença de fibras hipertróficas ($p < 0,05$), hipertrofia de fibras do tipo 2 ($p < 0,05$) e fibras angulares escuras atroficas na NADH-tetrazolium reductase ($p < 0,05$).

COMENTÁRIOS

Com a descoberta da localização do gene da distrofia muscular de Duchenne no locus cromossomal Xp21 e a caracterização da distrofina^{10,13,15,19}, qualquer miopatia por mutação do gene nesse local deve ser considerada como variante da mesma, como ocorre com a distrofia muscular de Becker, que pode ser considerada uma forma alélica e com heterogeneidade fenotípica^{2,18,22}. A partir da identificação do produto do gene desse locus cromossomal, foi possível identificar morfológicamente e quantificar a presença da distrofina^{1,3,12}. A distrofina constitui 0,002% do total de proteínas do músculo esquelético e é proteína com 3685 amino-ácidos, constituída de 4 porções. Tem algumas características das proteínas estruturais da célula muscular, como a spectrina e alfa-actina, embora possua em uma das porções terminais uma cadeia de 420 amino-ácidos, sem semelhança com qualquer outra proteína conhecida^{10,16}. A distrofina está associada às junções das tríades com o sarcolema dos mús-

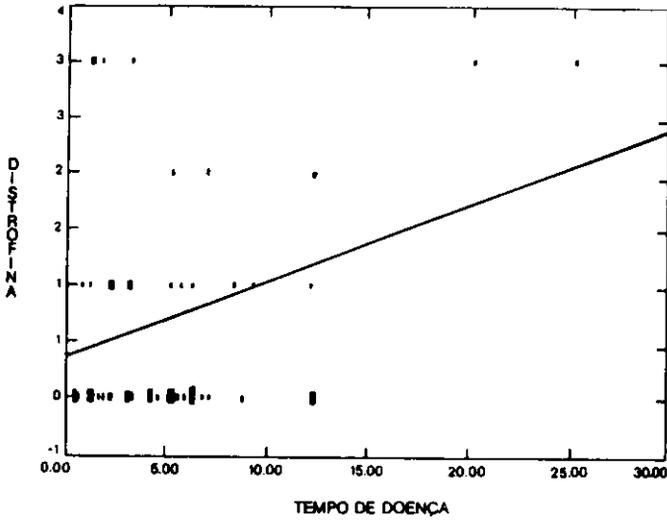


Fig. 5 (no alto) — Relação da intensidade da distrofina na imunofluorescência com o tempo de doença (anos).

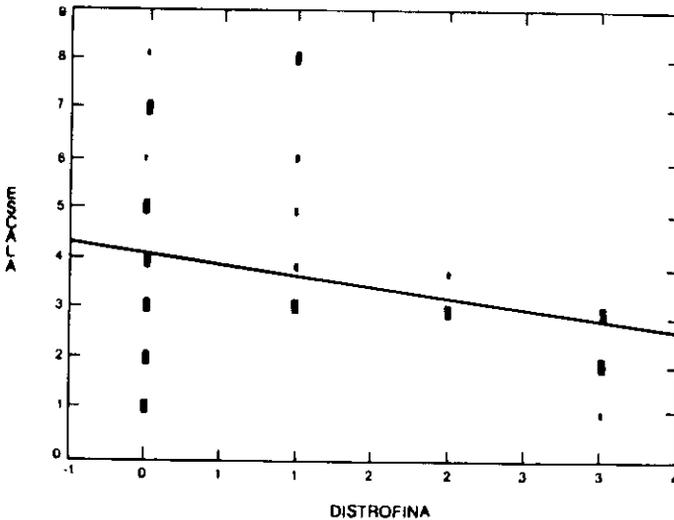


Fig. 6 (em baixo) — Relação entre a escala de Vignos e Archibald com a intensidade da distrofina na imunofluorescência.

culos esqueléticos, que tem importante função no controle da homeostase das fibras, regulando a entrada dos íons cálcio. Qualquer processo que altere esta função, pode determinar aumento intracelular dos íons cálcio, ativando proteases (fosfolipase A), causando dissolução das membranas internas e necrose da miofibrila. A distrofina parece ter papel de suporte das triades, túbulos T e sarcolema, sua deficiência sendo, talvez, um dos determinantes da lesão muscular 13.

A ausência de distrofina nos casos de distrofia muscular de Duchenne e deficiência parcial ou focal nos casos de Becker veio permitir diagnóstico diferencial acurado de ambas 11,14. Desde a descrição de Becker, em 1955, de forma mais benigna de distrofia muscular, com herança semelhante à distrofia muscular de Duchenne, surgiram dificuldades no diagnóstico diferencial em alguns casos, levantando dúvidas se eram entidades diferentes ou, forma mais branda da mesma doença. Os pacientes com distrofia muscular de Becker apresentam, como fato comum, o início tardio dos sintomas, deambulam por períodos mais longos e são menos afetados clinicamente que aqueles com distrofia de Duchenne 5,17,21,23,26. As enzimas séricas estão bastante elevadas nos pacientes mais jovens e se reduzem conforme aumenta a idade 5,17,26. As

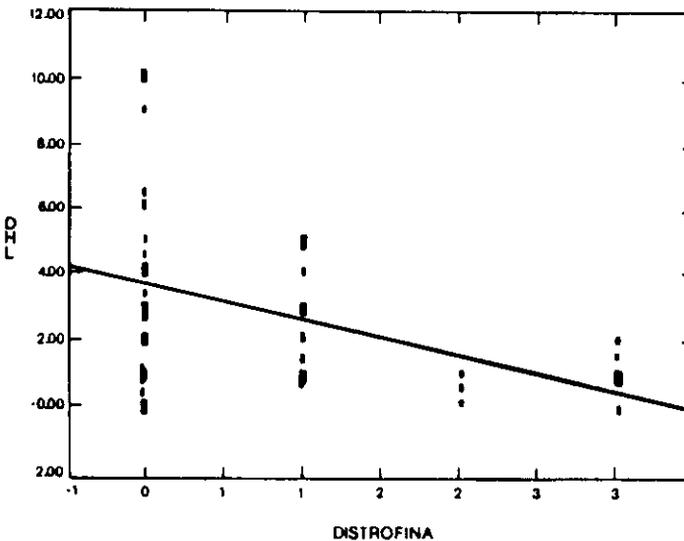
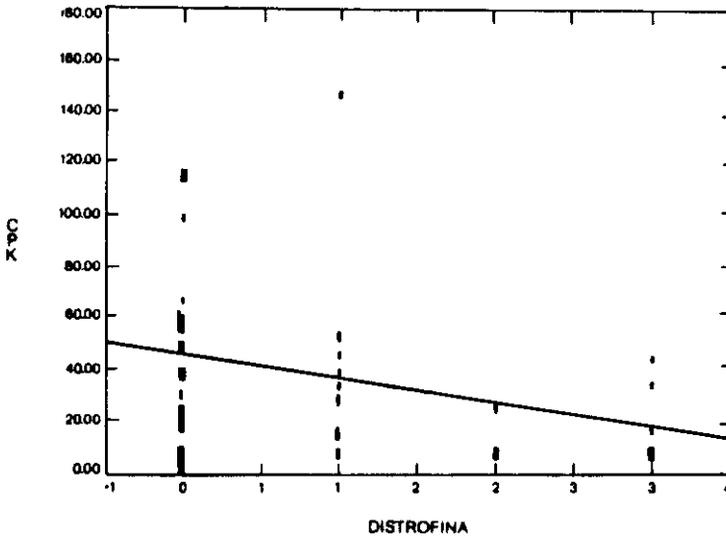


Fig. 7 (no alto) — Relação dos níveis de creatinquinase (CPK) com a intensidade da distrofina na imunofluorescência.

Fig. 8 (em baixo) — Relação dos níveis de desidrogenase láctica (DHL) com a intensidade da distrofina na imunofluorescência.

biópsias musculares foram relatadas como semelhantes em ambas entidades²⁶, ou então que os casos de Becker possuíam alterações idênticas às dos pacientes com Duchenne estudados precocemente¹⁷. Utilizando critérios diferentes para avaliação, alguns autores acreditam que existe na distrofia de Becker maior quantidade de fibras hipertróficas de ambos os tipos, fibras em segmentação, fibras angulares atroficas, áreas de grumos nucleares, fosfatase ácida aumentada no interstício e nas fibras, maior número de fibras positivas na fosfatase alcalina, com relativamente pouca necrose e fibrose endomisial, comparando aos casos de Duchenne^{5,21}. No presente material, tivemos concordância das biópsias musculares e diagnóstico clínico em 76,4% dos casos, utilizando a técnica da imunofluorescência para distrofina.

Em 12 casos de distrofia muscular de Duchenne verificamos atividade residual de distrofina em algumas fibras, parecendo corresponder aos casos catalogados como «outliners» na literatura^{11,14}. Este grupo de pacientes diferencia-se dos casos de Duchenne clássicos por apresentar evolução mais lenta, deambulando até os 15 ou 20

anos de idade. Encontramos boa relação entre os achados clínicos e a quantidade de distrofina presente nas biópsias musculares deste estudo, corroborado por investigações publicadas recentemente^{11,14}. Quanto mais próximo do normal a distrofina estiver, menor será o déficit funcional e a alteração laboratorial encontrada.

A técnica imuno-histoquímica e a detecção da distrofina por outros métodos foram empregadas quase exclusivamente em casos de Duchenne e Becker. Nos poucos casos de mães portadoras de distrofia muscular de Duchenne que foram testadas existiam fibras com deficiência de distrofina no meio de fibras normais e fibras com falhas nas membranas, semelhantes às encontradas nos casos de Becker⁴. Foi relatado que, em 3 casos de polimiosite, 5 de distrofia miotônica, 5 de distrofia fascio-escapulo-umeral, 1 de distrofia muscular distal de Miyoshi, 1 de artrogrifose múltipla congênita, 3 de escoliose idiopática, 1 de hipertermia maligna, 1 com deficiência do hormônio de crescimento e 3 com atrofia muscular espinal, a distrofina testada pela imunofluorescência era idêntica aos controles normais, exceto em um caso de distrofia muscular congênita de Fukuyama^{1,3}. Através de técnicas para análise do DNA e Western-Blot, foi possível diferenciar com segurança dois casos de distrofia muscular recessiva da infância e detectar a presença de uma distrofina anormal em família com mialgias e câibras familiar ligada ao cromossoma X^{5,20}. Estudos em outras doenças musculares estão sendo realizados para verificar a acurácia da reação imuno-histoquímica e se revela fenômeno típico das distrofias de Duchenne e Becker, bem como a relação do tipo deleção gênica e a qualidade da molécula de distrofina.

A detecção da distrofina nas biópsias musculares tem importância para um diagnóstico correto, permitindo emitir prognóstico sobre a progressão da doença e para aconselhamento genético, não influenciando atualmente no manejo clínico dos pacientes, que devem continuar com a fisioterapia e medidas ortopédicas adequadas, independentemente do diagnóstico. A esperança é que futuros estudos nessa área permitam fornecer subsídios para um tratamento efetivo das distrofias musculares.

REFERÊNCIAS

1. Arahata K, Hoffman E, Kunkel LM, Ishiura S, Tsukahara T, Ishihara T, Sunohara N, Nonaka I, Ozawa E, Sugita H — Dystrophin diagnosis: comparison of dystrophin abnormalities by immunofluorescence and immunoblot analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7154-1758, 1989.
2. Baumbach LL, Chamberlain JS, Ward PA, Farwell NJ, Caskey CT — Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology* 39:465-474, 1989.
3. Bonilla E, Samitt CE, Miranda AF, Hays AP, Salviat G, DiMauro S, Kunkel LM, Hoffman EP, Rowland LP — Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 54:447-452, 1988.
4. Bonilla E, Schmidt B, Samitt CE, Miranda AF, Hays A, Oliveira ABS, Chang HW, Servidei S, Ricci E, Younger D, DiMauro S — Normal and dystrophin-deficient muscle fibers in carriers of the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Am J Pathol* 133:440-445, 1988.
5. Bradley WG, Jones MZ, Fawcett PRW — Becker-type muscular dystrophy. *Muscle & Nerve* 1:111-132, 1978.
6. Brooke MH, Fenichel GM, Griggs RC, Mendell JR, Moxley R, Miller JP, Province MA, Cidd Group — Clinical investigation in Duchenne dystrophy: 2. Determination of the power of therapeutic trials based on the natural history. *Muscle & Nerve* 6:91-103, 1983.
7. Gospe SM Jr, Lazaro RP, Lava NS, Grootsholten PM, Scott MO, Fischbeck KH — Familial X-linked myalgia and cramps: a nonprogressive myopathy associated with a deletion in the dystrophin gene. *Neurology* 39:1277-1280, 1989.
8. Gutmann DH, Fischbeck KH — Molecular biology of Duchenne and Becker muscular dystrophy: clinical applications. *Ann Neurol* 26:189-194, 1989.
9. Hart KA, Hodgson S, Walker A, Cole CG, Johnson L, Dubowitz V, Bobrow M — DNA deletion in mild and severe Becker muscular dystrophy. *Hum Genet* 75:281-285, 1987.
10. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM — Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51:919-928, 1987.
11. Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, Harris JB, Waterston R, Brooke MH, Specht L, Kupsky W, Chamberlain J, Caskey T, Shapiro F, Kunkel LM — Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 318:1363-1368, 1988.

12. Hoffman EP, Hudecki MS, Rosenberg PA, Pollina CM, Kunkel LM — Cell and fiber-type distribution of dystrophin. *Neuron* 1:411-420, 1988.
13. Hoffman EP, Knudson CM, Campbell KP, Kunkel LM — Subcellular fraction of dystrophin to the triads of skeletal muscle. *Nature* 330:754-758, 1987.
14. Hoffman EP, Kunkel LM, Angelini C, Clarke A, Johnson M, Harris JB — Improved diagnosis of Becker muscular dystrophy by dystrophin testing. *Neurology* 39:1011-1017, 1989.
15. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM — Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50:509-517, 1987.
16. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM — The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53:219-228, 1988.
17. Markand ON, North RR, D'Agostino AN, Daly DD — Benign sex-linked muscular dystrophy. *Neurology* 19:617-633, 1969.
18. Medori R, Brooke MH, Waterston RH — Genetic abnormalities in Duchenne and Becker dystrophies: clinical correlations. *Neurology* 39:461-465, 1989.
19. Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM — Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323:646-650, 1986.
20. Normam AM, Hughes HE, Gardner-Medwin D, Nicholson LVB — Dystrophin analysis in the diagnosis of muscular dystrophy. *Arch Dis Child* 64:1501-1503, 1989.
21. Ringel SP, Carroll JE, Schold SC — The spectrum of mild X-linked recessive muscular dystrophy. *Arch Neurol* 34:408-416, 1977.
22. Rowland LP — Clinical concepts of Duchenne muscular dystrophy. *Brain* 111:479-495, 1988.
23. Shaw RF, Dreifuss FE — Mild and severe forms of X-linked muscular dystrophy. *Arch Neurol* 20:451-460, 1969.
24. Werneck LC — O valor da biópsia muscular em neurologia. *Rev Bras Clin Terap* 10 (ed esp):2-22, 1981.
25. Werneck LC, Lima JGC — Muscle biopsy correlated with electromyography. *Arq Neuro-Psiquiat (São Paulo)* 46:156-165, 1988.
26. Zellweger H, Hanson JW — Slowly progressive X-linked recessive muscular dystrophy (Type IIb). *Arch Intern Med* 120:525-535, 1967.